



**Universidad de Concepción
Facultad Farmacia**

**LIBERACIÓN DE DOPAMINA ASOCIADA A
REGULACIÓN ALOSTÉRICA POR ETANOL EN
RECEPTORES DE GLICINA**

POR CRISTÓBAL SEBASTIÁN AGUAYO GARRIDO

Trabajo de Tesis presentado en la Facultad de Farmacia de la Universidad de
Concepción para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor Guía

Dr. Luis Gerardo Aguayo Hernández
Laboratorio de neurofisiología
Facultad de ciencias biológicas

Enero, 2022

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

AGRADECIMIENTOS

Dentro de este camino que es la vida, sin duda alguna, este es un gran paso en lo que es mi formación como profesional y como persona. Pero no es solo un mérito propio, este camino ha estado lleno de personas que me han llevado a continuar adelante, es por ello que agradezco en primera instancia a mi padre y madre, mis dos pilares fundamentales que con sus valores siempre me impulsaron a seguir y buscar nuevas metas; agradezco a mi hermano, cuyo apoyo y soporte me permitió creer más en mí mismo; a mis amigos, que siempre me dieron una palabra de aliento cuando lo necesitaba, y a mis mascotas, que con su amor y cariño incondicional formaron parte de esta red emocional que me permitió seguir avanzando.

De igual forma agradezco a mi casa de estudio, a los profesores que me guiaron durante estos años permitiéndome enamorarme más de esta carrera y finalmente a mi profesor guía Dr. Luis Aguayo, quien me ha acompañado telemáticamente durante todo este proceso y me ha motivado en cada reunión a aprender mas de esta área de la ciencia. Además, agradezco los excelentes comentarios de los Drs. Fernando Sepúlveda y Patricio Castro miembros de mi Comisión de Tesis.

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
EL ALCOHOLISMO ES UN PROBLEMA MUNDIAL	3
ETANOL EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)	6
SISTEMA DE RECOMPENSA Y AVERSIÓN	7
RECEPTORES DE GLICINA	11
MODULACIÓN DEL RECEPTOR DE GLICINA MEDIADA POR ETANOL	14
RECEPTORES DE GLICINA EN EL NÚCLEO ACCUMBENS	17
PRESENCIA DE RECEPTORES DE GLICINA SINÁPTICOS Y NO- SINÁPTICOS	18
RECEPTORES DE GLICINA EN EL COMPORTAMIENTO DE MODELOS ANIMALES FRENTE A ETANOL	20
CARACTERÍSTICAS CELULARES Y DE COMPORTAMIENTO DE RATÓN RGLY KI α 1	22
RECEPTORES DE GLICINA EN LA LIBERACIÓN DE DOPAMINA EN EL NÚCLEO ACCUMBENS	23

DOPAMINA Y SU METABOLISMO.	24
MÉTODOS USADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE DOPAMINA	28
BASES TEÓRICAS DE LA FLUORESCENCIA	30
PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE	33
DETERMINACIÓN DE DOPAMINA MEDIANTE BIOSENSORES DLIGHT1	36
MONITOREO DE ACTIVIDAD NEURONAL CON OPTOGENÉTICA.	40
CONSIDERACIONES E HIPÓTESIS	42
PROPUESTA METODOLÓGICA 1	43
MODELO ANIMAL	43
INYECCIÓN DE VECTOR VIRAL ADENO ASOCIADO CON DLIGHT1	46
PREPARACIÓN DE CORTES DE CEREBRO	48
INDUCCIÓN DE CORRIENTE SINÁPTICA ELÉCTRICAMENTE ACTIVADA Y REGISTRO DE FLUORESCENCIA EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE ETANOL	49
PROPUESTA METODOLÓGICA 2	51
VECTOR VIRAL ADENO ASOCIADO CON CHR2	51
ESTIMULACIÓN OPTOGENÉTICA	53
ANÁLISIS DE DATOS	55
CARTA GANTT	56
RESULTADOS ESPERADOS	56

DISCUSIÓN	58
CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES	61
GLOSARIO	63
BIBLIOGRAFÍA	66

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURA 1 - CIRCUITO LÍMBICO.	9
FIGURA 2 – ESQUEMA SIMPLIFICADO DEL SISTEMA DE RECOMPENSA Y AVERSIÓN.	10
FIGURA 3 - MODELO DE RECEPTOR DE GLICINA.	13
FIGURA 4 - SITIOS MOLECULARES DE MODULACIÓN ALOSTÉRICA.	16
FIGURA 5 - ESQUEMA GENERAL DE LA SEÑALIZACIÓN DE RECOMPENSA.	19
FIGURA 6 – BIOSÍNTESIS DE LA DOPAMINA.	26
FIGURA 7 – VÍA DOPAMINÉRGICA.	27
FIGURA 8 – UNA FORMA DEL DIAGRAMA DE JABLONSKI.	32
FIGURA 9 – DIAGRAMA ESQUEMATICO DE LA PROTEINA FLUORESCENTE VERDE.	35
FIGURA 10 – MODELO DLIGHT 1.	38
FIGURA 11 - MODELO ESQUEMÁTICO DEL FUNCIONAMIENTO DE DLIGHT1.	39
FIGURA 12 - OPTOGENÉTICA Y DLIGHT.	41

FIGURA 13 – EXPERIMENTO 1: MODELO ANIMAL Y GENOTIPIFICACION.	45
FIGURA 14 – EXPERIMENTO 2: VECTOR ASOCIADO A DLIGHT.	47
FIGURA 15 – EXPERIMENTO 3: VECTOR ASOCIADO A CHR2.	52
FIGURA 16 - EXPERIMENTO 4: REGISTRO DE FLUORESCENCIA MEDIADA POR ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA.	50
FIGURA 17 – EXPERIMENTO 5 Y 6: ESTIMULACIÓN OPTOGENÉTICA.	54

RESUMEN

Una de las problemáticas actuales más importante en salud es el alcoholismo, un proceso adictivo asociado al consumo excesivo de bebidas alcohólicas, que poseen como componente el etanol, un compuesto con actividades psicoactivas que afecta el sistema nervioso central (SNC), modulando incluso el sistema de recompensa y aversión, que por medio de neurotransmisores como la dopamina (DA) genera la recompensa para el aprendizaje de conductas. Del mismo modo, el etanol se ha visto involucrado en la modulación de receptores de glicina (RGly), siendo la hipótesis que existirá un mayor aumento de DA en el núcleo accumbens (nAc) de ratones con RGly insensibles al alcohol en exposiciones agudas de etanol.

En este texto se recabará la información atinente de la función del RGly en los mecanismos relacionados a una exposición aguda al etanol y sus efectos en las variaciones de DA extracelular en el nAc. Además, se propondrá una metodología para abarcar estudios que respondan la hipótesis, basados en modelos knock-in (KI) del RGly, biosensores y técnicas optogenéticas.

INTRODUCCIÓN

El escrito que se presenta en esta tesis corresponde a un documento que se ha desarrollado durante la pandemia del virus SARS-COV-2, es por ello, que en este texto no se presentarán resultados asociados a experimentos en laboratorio, producto de las medidas sanitarias tomadas. Sin embargo, no ha sido impedimento para la realización del presente trabajo, este consta de 3 objetivos centrales que se ejecutarán a lo largo de este manuscrito, estos son:

- 1. Revisión bibliográfica:** Se presentará el marco teórico asociado a la temática de la liberación de dopamina y receptores de glicina en el área ventral tegmental y el núcleo accumbens. Como criterio de búsqueda se utilizaron palabras claves descritas a continuación, tomando en cuenta preferentemente las publicaciones referentes a los últimos años (2010 en adelante), haciendo una excepción a publicaciones o libros cuya información sea relevante para esta tesis.

Palabras Claves: Alcoholismo, Alcohol, Sistema de recompensa, Núcleo accumbens, Área ventral Tegmental, Dopamina, Receptores de Glicina, dLight, Optogenética, Ratones KI RGly α 1.

2. Propuesta metodológica 1 – Rol del receptor de glicina en la liberación de dopamina en el núcleo accumbens frente a etanol:

Se presentará una propuesta para el desarrollo de estudios al interior del laboratorio, la cual esta basada en los datos obtenidos durante la revisión bibliográfica. En esta propuesta se entregará una metodología tentativa para responder a la pregunta de hipótesis, con el objetivo de reproducir un estudio que abarque de manera general lo que ocurre en el núcleo accumbens.

3. Propuesta metodológica 2 – Comunicación entre el área ventral tegmental y el núcleo accumbens frente a la regulación de los receptores de glicina por etanol: Se propondrá una segunda metodología que busca evidenciar de forma más específica la participación del área ventral tegmental en la liberación de dopamina hacia el núcleo accumbens y los posibles efectos del etanol en estas regiones del cerebro mediando el funcionamiento de los receptores de glicina.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

EL ALCOHOLISMO ES UN PROBLEMA MUNDIAL

El alcohol es una sustancia que ha sido consumida desde hace miles de años por múltiples civilizaciones, y producidas mediante cereales fermentados, frutas y miel, que encontraron múltiples formas de su obtención, ya sea con fines recreativos, para ritos religiosos, en ceremonias u eventos sociales. Sin embargo, en la actualidad esta sustancia es consumida principalmente para fines recreacionales y/o sociales^[23].

En las bebidas alcohólicas el principal tipo de alcohol que podemos encontrar corresponde al etanol, un compuesto químico orgánico de estructura simple, incoloro, inflamable y además presenta una actividad psicoactiva. Se ha observado que su consumo moderado puede generar efectos protectores en el organismo, sin embargo, su consumo excesivo y de manera crónica se asocia a diversos problemas en distintos órganos, desde el tracto digestivo, el sistema cardiaco e incluso en el sistema nervioso central^[14]. Dado esto, un abuso en el consumo de alcohol puede generar diversos trastornos e incluso cambios en el

comportamiento y desde esta perspectiva no es raro encontrar la dependencia al alcohol, comúnmente denominada como alcoholismo. Esta dependencia representa tanto una carga económica, social y de salud, siendo catalogada como el tercer factor de riesgo más importante de muerte prematura e incapacidad a nivel mundial^[29].

Mediante varios informes de situación de salud mundial ha quedado en evidencia este preocupante escenario, en estos, se ha observado que el consumo de alcohol comienza antes de los 15 años en muchos países de las Américas, Europa y el Pacífico Occidental, siendo entre los 15 a 19 años alrededor de 155 millones de jóvenes que son bebedores, más de una cuarta parte (26,5%) de todos los jóvenes a nivel mundial. Del mismo modo, indican que el consumo total de alcohol por habitante en la población mundial mayor a 15 años para el 2016 fue de 6,4 litros, y las predicciones en esta cifra sugieren un aumento a futuro, indicando que para el año 2020 y 2025 el consumo sería de 6,6 y 7,0 litros respectivamente^[30]. Tanto la temprana edad de consumo, como también las predicciones asociadas al consumo mundial de alcohol son indicios de un posible aumento en los casos de adicciones a bebidas alcohólicas.

En Chile, el alcoholismo también representa una problemática de salud pública, en donde 1 de cada 10 personas presenta un consumo riesgoso de alcohol para la salud, concentrándose mayormente en jóvenes de entre 15 a 24 años. La prevalencia de trastornos por consumo está presente en un 1,9% de la población mayor de 18 años, mientras que alrededor de 260.000 individuos ya presentarían un trastorno asociado al consumo de alcohol^[17].

Producto de esta alarmante situación de salud pública, que incide a nivel mundial, múltiples han sido las investigaciones realizadas para entender los diversos procesos que influyen en la producción de adicción a drogas de abuso como lo es el alcohol, con lo cual, en la actualidad se reconocen bastante bien los efectos clínicos que se producen en el ser humano. Por otro lado, los conocimientos sobre los mecanismos para entender su funcionamiento en el sistema nervioso central (SNC), aun presentan varios vacíos, y resolverlos nos podría ayudar a entender mejor los procesos para generar una dependencia e incluso posibles tratamientos para combatir el alcoholismo a nivel mundial.

ETANOL EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)

El etanol es una droga depresora del SNC y actúa produciendo una amplia gama de efectos, tanto en sistemas excitatorios como también inhibitorios, generando efectos que se combinan y producen estados característicos, como lo son la elevación del estado de ánimo, efectos ansiolíticos, sedantes y atáxicos [25]. Su funcionamiento dentro del SNC ha sido ampliamente descrita, lo que ha permitido reconocer los diversos blancos primarios en los que esté actúa, dentro de los cuales se encuentran los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido γ -aminobutírico (GABA_A), 5-hidroxitriptamina (5-HT), receptores nicotínicos neuronales de acetilcolina (nACh) y receptores de Glicina (RGly), como también algunos canales tipo L de Ca²⁺ y proteínas G activadas por canales de potasio rectificadores internos [31]. Si bien, se observan diversos potenciales blancos de estudio para comprender más a fondo los mecanismos del etanol en el SNC, publicaciones recientes han indicado su función como modulador alostérico positivo (PAM) en receptores de glicina (RGly). Mutaciones en estos han producido cambios en el comportamiento en ratones, evidenciado principalmente por medio de estudios de lugares de preferencia condicionada (CPP)^[21]. Además, estos estudios indican una conexión entre la presencia del alcohol y su potencial actividad en el sistema de recompensa y aversión, que son esenciales en el aprendizaje de hábitos y comportamientos.

SISTEMA DE RECOMPENSA Y AVERSIÓN

Este sistema corresponde a un complejo circuito que se activa en el cerebro y por medio del cual adaptamos nuestro comportamiento, para adquirir recompensas y evitar castigos. Esta maquinaria es regulada por neuromoduladores dentro de los que encontramos la Dopamina (DA) y la serotonina (5-HT)^[9]. Investigaciones han destacado que las señales dopaminérgicas están relacionadas principalmente con el proceso de recompensa, sin embargo, también se le ve implicado en aversión y en señales de alerta ^[9]. A su vez, también se sugiere que la serotonina estaría mayormente asociada a inhibición, supresión de la recompensa y antagonizar a la DA. Cabe destacar que la Dopamina jugaría un papel clave en el proceso de aprendizaje, principalmente asociada al inicio de una respuesta positiva, ya sea esperada o inesperada. También disminuye sus niveles cuando la recompensa es omitida, es decir, se le asociaría a anticipación, preparación y aproximación más que con la respuesta de comportamiento positivo en sí. Sin embargo, se ha propuesto la existencia de una plasticidad sináptica iniciada por dopamina que llevaría a los animales en la elección de una acción que conduce a una recompensa optima ^[9].

El sistema dopaminérgico dentro del SNC posee diversas funciones, pero es mediante la vía mesolímbica que se ve involucrada en el sistema de recompensa. Esta vía implica varias regiones del SNC, iniciando en el Área Ventral Tegmental (VTA), donde las neuronas dopaminérgicas inervan hacia el sistema límbico a través del núcleo accumbens (nAc), la amígdala, el hipocampo y la corteza prefrontal (Figura 1 y 2) ^[25].

Los cambios en la transmisión de dopamina modulan la información que procesa el sistema límbico, de los cuales se ha visto que la DA produciría un efecto reforzador en varias drogas de abuso ^[25] y que además se presentaría un aumento de este neurotransmisor por diferentes mecanismos, como es el caso de la cocaína, en donde es producto de un bloqueo de los transportadores de dopamina ^[34]. Del mismo modo es importante entender los mecanismos por medio del cual el alcohol es capaz de generar cambios en los niveles de dopamina dentro del sistema mesolímbico y, dado que los RGly se han visto involucrados en cambios conductuales, podría ser una herramienta para un mejor entendimiento de este proceso.

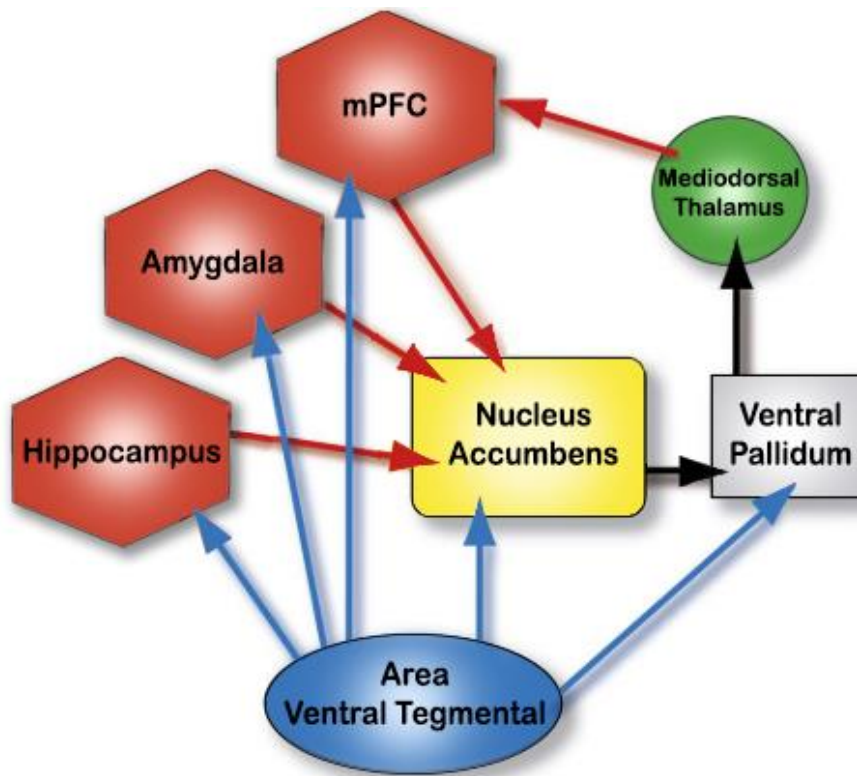


FIGURA 1 - Circuito límbico.

Las flechas rojas indican la vía glutamatérgica; las flechas negras indican la vía GABAérgica; las flechas azules indican la vía dopaminérgica.

Modificado de Pierce, R. C. and V. Kumaresan, Neurosci Biobehav Rev, 2006.

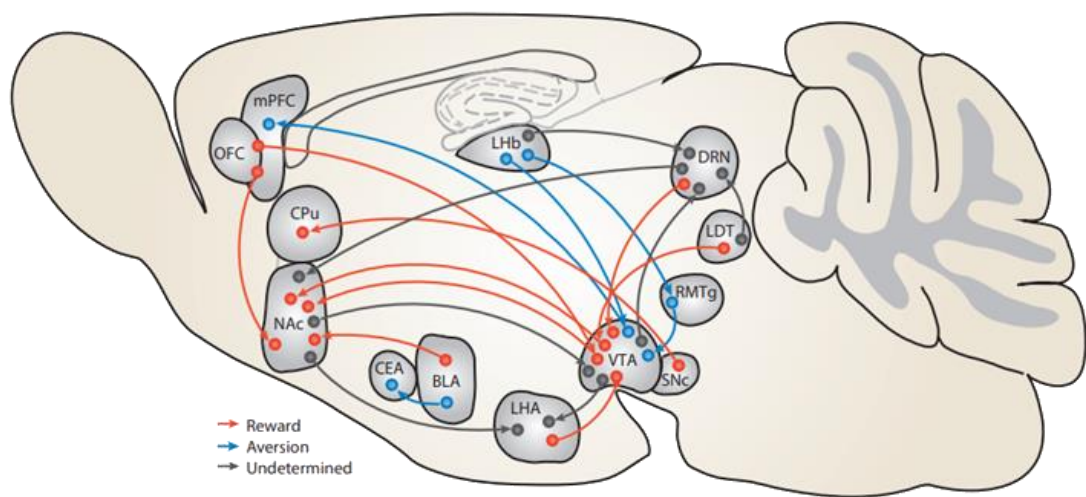


FIGURA 2 – Esquema simplificado del sistema de recompensa y aversión.

Se resumen las diferentes vías neuronales mediadoras de la recompensa (color rojo) y de aversión (color azul), como también algunas vías cuya función aún no ha sido determinada (color gris).

Hu H., Annual Review of Neuroscience, 2016.

RECEPTORES DE GLICINA

Los RGly pertenecen a la superfamilia de receptores Cys-loop de canales iónicos gatillados por ligando (LGIC), cuyo canal es selectivo para iones Cl^- , por medio del cual genera hiperpolarización postsináptica. Tienen un importante rol en la regulación de funciones mayores del cerebro, como la señalización para la visión, la audición y el dolor, como también en la regulación del tono muscular y el movimiento, esto lo realizan por medio de la mediación de sinapsis inhibitorias presentes en la médula espinal y el tronco encefálico ^[10].

Su estructura corresponde a un complejo pentamérico que puede estar compuesto por 5 subunidades α homologas o bien subunidades que formen un heteropentámero entre α y β , de las cuales han sido descrito mediante estudios en ratones 4 subunidades α ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) y una subunidad β , siendo esta última asociada principalmente a una función estructural. Esta composición es similar en los seres humanos en donde se presentan las mismas subunidades excepto la subunidad $\alpha 4$, ya que en el ADN humano esta subunidad es un pseudogen debido a un codón de término prematuro ^[35].

Su agonista principal es el neurotransmisor glicina y en algunos estudios se menciona a la taurina y β -alanina como agonistas parciales, mientras que su antagonista más clásico y potente es la estriknina (STN), un alcaloide altamente tóxico, incoloro y de sabor amargo presente en *Strychnos nux vómica* ^[1]. Su sitio de unión está parcialmente superpuesta al sitio de reconocimiento de glicina dentro del receptor, por lo que su comportamiento corresponde al de un antagonista competitivo y su efecto en RGly es dosis dependiente ^[20]. La presencia de anomalías en estos receptores ya sea por falta del receptor o mutaciones en él, este asociado a diversas patologías dentro de las cuales están la hipereflexia, mioclono y en trastornos de sobresaltos ^[27].

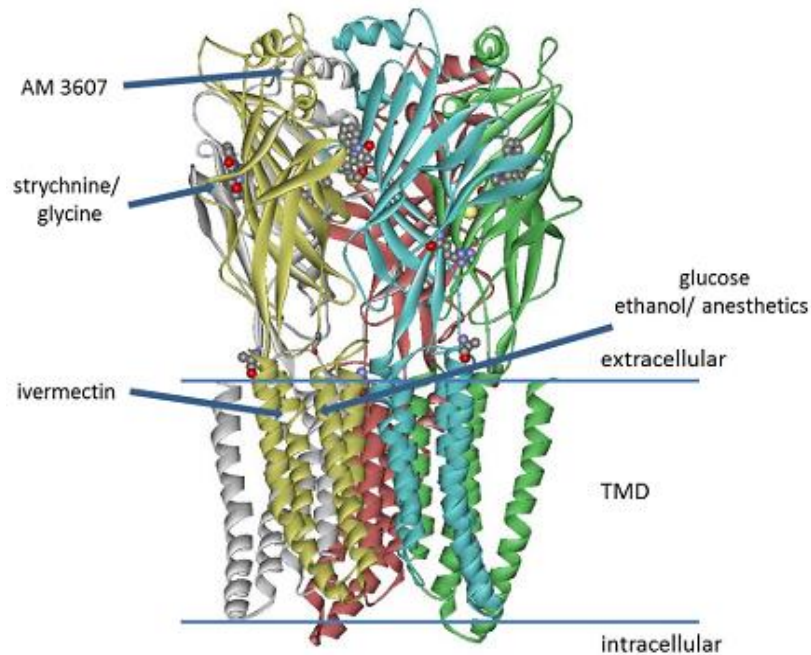


FIGURA 3 - Modelo de receptor de glicina.

Modelo adaptado a partir de datos del Protein data Bank de la estructura de crio-microscopía electrónica de pez cebra $\alpha 1$, las regiones de unión para el etanol han sido postuladas a través de estudios de mutagénesis y análisis de funcionalidad. Las líneas indican los sitios de unión de los diferentes compuestos que interaccionan con el receptor, desde su agonista glicina, antagonista estricnina (STN), ivermectin un modulador de sensibilidad a STN y potenciadores alostéricos del receptor, como lo es AM 3607.

Hussein, R. A., et al, Mol Neurosc, 2019.

MODULACIÓN DEL RECEPTOR DE GLICINA MEDIADA POR ETANOL

El etanol es un modulador alostérico positivo (PAM) cuya presencia genera una potenciación de la función de los receptores de glicina, mediante el cual produce una disminución en los tiempos entre eventos de apertura de canales del ion Cl^- , esto dado por una reducción en el tiempo de unión de la glicina y el receptor ^[7].

Existen dos mecanismos por medio del cual el etanol es capaz de efectuar esta potenciación. **1)** La primera corresponde a la unión directa del etanol al receptor de glicina en las posiciones A52 y S267, cuya sensibilidad de unión es controlada por los residuos S267 y T264 ^[35]. Esta potenciación puede ser producida por distintos alcoholes, en donde al aumentar el número de carbonos de n-alcoholes incrementa su potencia hasta llegar a un número de 10 carbonos, frente a un número mayor de carbonos en la cadena no se observa una variación en la potenciación^[1]. **2)** El segundo mecanismo de potenciación sería mediado por proteína G en el cual se cree que el mecanismo involucrado dependería de la liberación de $\text{G}\beta\gamma$ desde la proteína heterotrimérica ^[36].

Los efectos que el etanol puede mediar al interaccionar con el receptor dependerán tanto de su concentración administrada y también la composición del receptor de glicina. En cuanto a la concentración de etanol, estudios realizados en neuronas dopaminérgicas espinosas medianas, indican que en presencia de altas concentraciones de etanol (100 mM) resultan en disminución de potenciales de acción. En presencia de menores concentraciones de etanol (10 mM y 50 mM) se observaron los mismos efectos en los potenciales de acción, sin embargo, estas serían de una menor intensidad, es decir, un efecto dosis dependiente [7]. Respecto a las formas en las cuales pueden estar dispuestos los pentámeros que del RGly, las subunidades funcionales (α) presentan diferencias en cuanto a la sensibilidad al alcohol. Investigaciones indican que los pentámeros asociados a la subunidad $\alpha 1$ presentan una mayor sensibilidad al etanol que las subunidades $\alpha 2$, producto de que en estos no existirían las propiedades moleculares de unión para ser directamente modulados por el alcohol, sin embargo, sí podrían ser moduladas indirectamente por la proteína G [35].

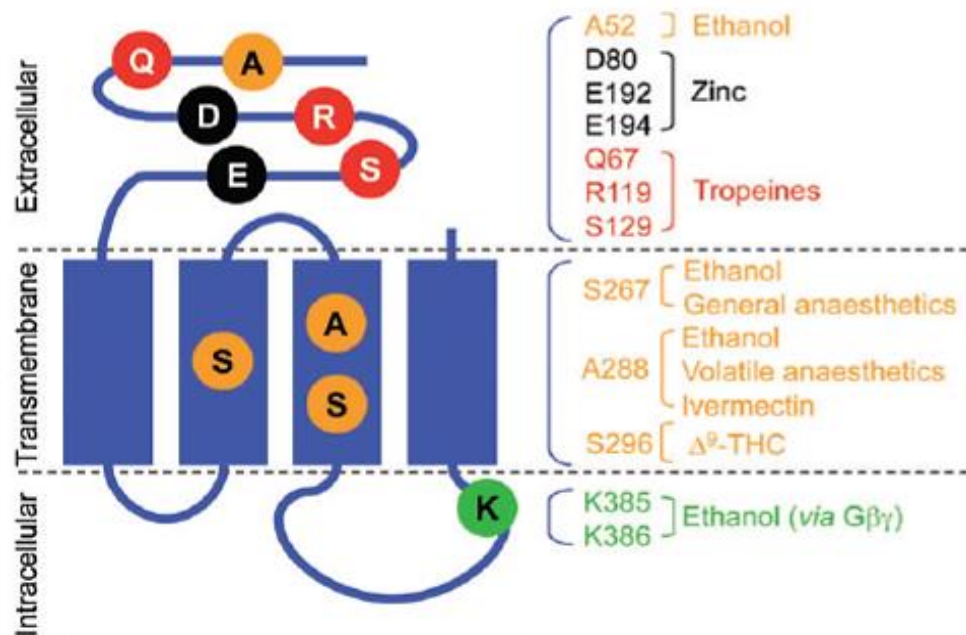


FIGURA 4 - Sitios moleculares de modulación alostérica.

Estos sitios han sido identificados mediante estudios funcionales en receptores de glicina $\alpha 1$, presentando una modulación alostérica positiva en los residuos A52 y S267, como también son modulación vía proteína G en los residuos K385 y K386.

Yevenes, G. E., & Zeilhofer, H. U., Br J Pharmacol, 2011.

RECEPTORES DE GLICINA EN EL NÚCLEO ACCUMBENS

En el núcleo accumbens encontramos dos tipos de neuronas espinales medianas (MSNs), las neuronas con receptores de dopamina tipo 1 (D1) y las del tipo 2 (D2), en este aspecto diversos estudios soportan la teoría de que estas neuronas serían antagónicas entre sí, en donde D1 se asocia con una vía de “ir” que facilita una acción, mientras que D2 sería una vía de “no ir” la cual suprime una acción ^[9]. Desde el nAc se libera GABA hacia las distintas zonas que inerva, y es aquí donde las MSN-D2 poseen proyecciones hacia el pálido ventral (VP), mientras que las MSN-D1 inervan tanto a la sustancia negra pars reticulata, como también al VP y al VTA ^[22]. La presencia de RGly en MSNs ha sido identificada, las cuales serían muy sensibles al alcohol, donde se ha señalado que estos receptores estarían compuestos mayormente de la subunidad $\alpha 1$ tanto en D1-MSNs y D2-MSNs. Sin embargo, también encontraríamos la subunidad $\alpha 2$, la que se encontraría en mayor cantidad en D1-MSNs y reducidas en D2-MSNs. En esta misma investigación se indica que los RGly sinápticos no se encontraban afectados por el etanol, por lo que aparentemente existirían receptores no-sinápticos los cuales podrían modular esta respuesta a etanol ^[21].

PRESENCIA DE RECEPTORES DE GLICINA SINÁPTICOS Y NO-SINÁPTICOS

Los receptores de glicina sinápticos presentan una respuesta fásica que los caracteriza, sin embargo, estos no serían los únicos receptores de glicina presentes en neuronas espinosas medianas (MSNs), sino que además existirían receptores no sinápticos los cuales generarían una respuesta de corriente tónica y que responderían selectivamente a bajas concentraciones del ligando ^[16].

RECEPTORES DE GLICINA EN EL COMPORTAMIENTO DE MODELOS ANIMALES FRENTE A ETANOL

Los modelos animales murinos han sido la principal forma de evaluar los efectos del alcohol de estos receptores, en los que para su estudio se han utilizado diversos tipos de modificaciones genéticas, siendo utilizado desde ratones Knock-out (KO), que no expresan un subtipo de receptores, hasta ratones Knock-in (KI), en el cual se inserta una mutación dentro del receptor, para una mejor comprensión de las distintas implicaciones que tiene tanto la presencia y ausencia de los receptores como también su sensibilidad a la modulación por etanol [8; 16; 21].

Por medio de estudios en ratones KO RGly $\alpha 2$ se demostró que los ratones adultos consumían menor cantidad de alcohol e incluso presentaban aversión a este líquido^[16]. Sin embargo, los RGly $\alpha 2$ parecen importantes en los procesos de migración de neuronas corticales durante la embriogénesis^[8]. A pesar de que los ratones sobrevivieron demostraron deficiencias en la memoria a largo y corto plazo, este desarrollo anormal del ratón por falta del receptor puede llevar a compensaciones nerviosas, lo cual podría modificar la actividad de los otros receptores como el GABA_A^[8].

Por su parte los estudios en ratones KI, han permitido identificar de mejor forma la importancia de etanol, en la modulación de estos receptores dado principalmente por el uso de RGly KI insensibles al alcohol. Dentro de estos estudios encontramos el RGly KI $\alpha 1$ y el RGly KI $\alpha 2$, y por medio de comparación con ratones wild type (WT) se ha podido determinar los cambios en el comportamiento de los ratones al estar expuestos al alcohol y que rol juega cada uno de estos receptores^[8; 21].

CARACTERÍSTICAS CELULARES Y DE COMPORTAMIENTO DE RATÓN

RGLY KI α 1

Investigaciones en modelos animales han indicado que en los ratones cuyos receptores son insensibles al alcohol generaron un efecto significativamente menor en presencia de distintas concentraciones de esta droga en las neuronas KI. En cuanto al comportamiento de estos ratones se presenta un primer consumo alto al alcohol en comparación a los WT, según datos determinados mediante los ensayos DID (Drinking in the dark), lo cual podría asociarse a su función en la regulación del sistema de recompensa y aversión, en donde el ratón KI presentaría un estímulo de recompensa mayor que el WT en la primera exposición. Además, mediante los estudios de lugar de preferencia condicionada se determinó que los ratones KI generan rápidamente una preferencia por el lugar con alcohol lo cual sugiere que la recompensa, y el reforzamiento de conductas están asociado a la sensibilidad que tengan al alcohol^[21].

RECEPTORES DE GLICINA EN LA LIBERACIÓN DE DOPAMINA EN EL NÚCLEO ACCUMBENS

Investigaciones han mostrado una disminución en los niveles de dopamina al ser administrado el antagonista estricnina, mientras que en presencia de glicina se observó un aumento de dopamina, ambos efectos fueron demostrados en el núcleo accumbens y determinados por micro diálisis ^[19]. Del mismo modo, los datos se han asociado con el comportamiento en la preferencia de consumo de etanol, en donde se identificó alteraciones en el auto consumo de etanol por parte de ratones machos al ser administrados estos compuestos directamente en el nAc ^[19]. Sin embargo, aún no se han estudiado como se verían afectados estos niveles de dopamina en el núcleo accumbens al ser regulados por receptores de glicina en presencia de alcohol, específicamente frente a etanol, tanto tras una administración aguda, ni tampoco los cambios presentes cuando el uso de este compuesto es de forma crónica.

DOPAMINA Y SU METABOLISMO

La dopamina es un importante neurotransmisor en el SNC perteneciente al grupo de catecolaminas, junto a la adrenalina y noradrenalina, sin embargo, esta destaca de su grupo, dado que participa en una gran variedad de funciones como lo es la ingesta de agua y alimentos, la locomoción, la afectividad, entre otros, siendo a su vez, involucrada en diferentes enfermedades como lo es el Parkinson y esquizofrenia ^[33]. No obstante, también se ha asociado con procesos adictivos, como el consumo de cocaína, en donde se origina un aumento de dopamina producto del bloqueo de su transportador^[25].

Su metabolismo se inicia en las terminales nerviosas dopaminérgicas en donde las enzimas encargadas de su síntesis se encuentran en alta concentración. Es aquí donde la L-Tirosina es hidroxilada por la enzima Tirosina Hidroxilasa (TH) formando la L-Dopa (L-3,4-dihidroxifenilalanina) que posteriormente será descarboxilada por la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos o L-DOPA descarboxilasa generando dopamina (figura 6) ^[33]. Cabe destacar que normalmente la enzima TH esta saturada del aminoácido por lo que en este metabolismo el limitante es el nivel de TH y no la disponibilidad de sustrato^[26; 33].

La dopamina ya formada puede ser liberada directamente desde el citoplasma al espacio sináptico o bien ser transportada a vesículas sinápticas que están mayormente ancladas al citoesqueleto presináptico por medio de las sinapsinas I y II, las cuales mediante un gradiente electroquímico formado por iones Ca^{2+} y la actividad de la calmodulina, que fosforila a las sinapsinas, son transportadas a la zona activa, donde posteriormente se liberaran por exocitosis [15; 33]. Esta liberación puede ser regulada de diversos mecanismos en donde existen autoreceptores, como los receptores dopaminérgicos D_2 , y heteroreceptores, como los receptores GABA_B , glutamato, acetilcolina y serotonina, los cuales pueden regular la liberación y la síntesis de este neurotransmisor [15; 26; 33].

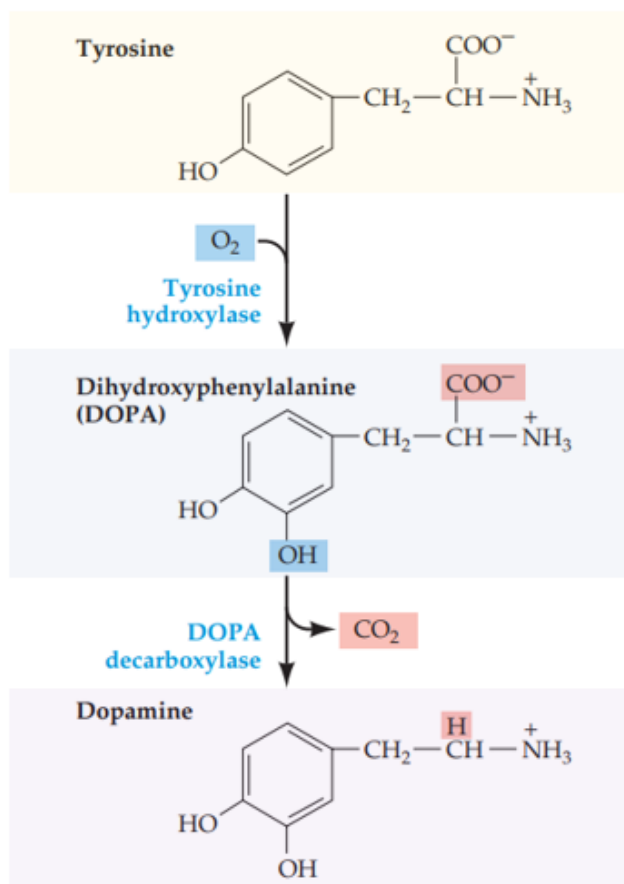


FIGURA 6 – Biosíntesis de la dopamina.

El aminoácido tirosina es el precursor de los neurotransmisores pertenecientes a las catecolaminas por medio del cual se obtienen la dopamina, adrenalina y noradrenalina.

Modificado de Purves, D., et al. Neuroscience, 2004.

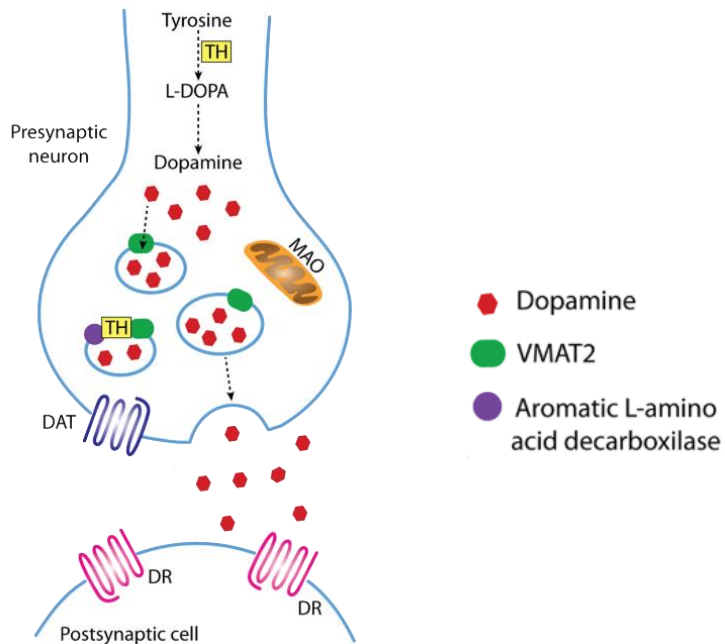


FIGURA 7 – Sinápsis dopaminérgica.

Esquema general de la síntesis y transmisión de la dopamina, la cual tras ser sintetizada es almacenada en vesículas sinápticas y posteriormente liberada al espacio sináptico, desde aquí puede interactuar con los receptores de dopamina (DR) o ser reintegrada por el transportador de dopamina (DAT), dirigiéndose nuevamente hacia las vesículas o ser degradado por la monoamina oxidasa (MAO).

Modificado de Klein, M. O., et al. Cell Mol Neurobiol, 2019.

MÉTODOS USADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE DOPAMINA

Existen varias técnicas para la determinación de dopamina, estas pueden ser por medio de técnicas electroquímicas, registros de células completas o de imagen. Dentro de ellas la mayormente usada es la electroquímica, donde destacan la voltametría cíclica de exploración rápida (FSCV) y la microdialisis^[15].

La FSCV utiliza un pequeño electrodo de fibra de carbono en el tejido *in vivo* o *in vitro* y se aplica una onda triangular a una velocidad de barrido rápida, donde los compuestos generan corrientes de oxidación y reducción diferentes, siendo a los 0,6 V el máximo generador de dopamina, sin embargo esta técnica requiere de una corriente de referencia y solo informa cambios en la dopamina, además la velocidad de exploración de esta técnica es lenta en comparación a la velocidad de exocitosis de la dopamina^[15].

La microdialisis se basa en el uso de una membrana semi permeable, en una microsonda, que es insertado quirúrgicamente en una región de interés del cerebro, mediante una solución tampón se logra un pseudo equilibrio con los solutos extracelulares no unidos del líquido extracelular^[6]. La ventaja de esta técnica es que permite la medición de los niveles basales *in vivo*, pero posee una baja resolución temporal, por lo que es inadecuado para evaluar transiciones rápidas de dopamina y el daño tisular generado por la sonda puede alterar las medidas^[15].

Dado que las técnicas mayormente usadas carecen de una buena resolución espacial o temporal, las investigaciones se han visto limitadas a la hora de realizar estudios en lugares específicos o en tiempos más extendidos. En este ámbito, el uso de nuevas técnicas o métodos para detectar la presencia o liberación de neurotransmisores tiene una alta importancia en investigación asociado a hábitos, conducta y adicciones, dando paso a nuevas formas de detección de neurotransmisores como lo son sensores fluorescentes codificados genéticamente como es dLight1^[24].

BASES TEÓRICAS DE LA FLUORESCENCIA

La luminiscencia corresponde a la emisión de luz que no es inducida por altas temperaturas, específicamente generada desde estados electrónicamente excitados provocando los fenómenos de fluorescencia o de fosforescencia. En el presente caso, se habla de fluorescencia en los eventos de absorción de energía que terminan en la emisión de parte de esta en forma de fotón a una longitud de onda más larga y la diferencia de energía es disipada en forma de calor, además, se diferencia de la fosforescencia por la orientación del spin y su rápida emisión del fotón^[13].

Comúnmente se utilizan los diagramas de Jabloski (Figura 8) como el punto de partida para la discusión de la absorción y emisión de luz. A grandes rasgos, el proceso de fluorescencia inicia cuando un electrón, producto de la absorción de energía, alcanza un orbital excitado y está apareado con un spin opuesto respecto al segundo electrón del orbital en el estrato basal, que es de menor energía, de esta forma el regreso del electrón a la órbita de baja energía está permitida por la orientación del spin, ocurriendo rápidamente una emisión de un fotón, cuya tasa de emisión es generalmente de 10^{-8} s^{-1} ^[13]. Este efecto de luminiscencia comúnmente ocurre en moléculas aromáticas cuyas sustancias son conocidas como fluoróforos y sus espectros de emisión dependen de las estructuras químicas presentes y del solvente en donde está disuelto^[13].

Dentro de este proceso es normal denotar que existe una diferencia entre la energía absorbida y la energía emitida, dicha desigualdad puede tener diferentes orígenes, destacando principalmente el rápido decaimiento entre los niveles de energía vibracional más altos a los más bajos dentro de los estados electrónicos (S). Producido principalmente a que la absorción y emisión de energía mayormente ocurre desde moléculas con los menores niveles de energía vibracional, a su vez de que la excitación electrónica ocurre hacia los niveles vibracionales más altos. También, en conjunto a que fluoróforos generalmente decaen en los niveles vibracionales más altos del estado electrónico basal (S_0) resultan en una mayor pérdida de energía que considera tanto la generación la emisión del fotón, como también la regulación interna del estado electrónico basal, siendo esta sumatoria de exceso de energía vibracional eliminada del sistema como energía térmica (Figura 8) ^[13].

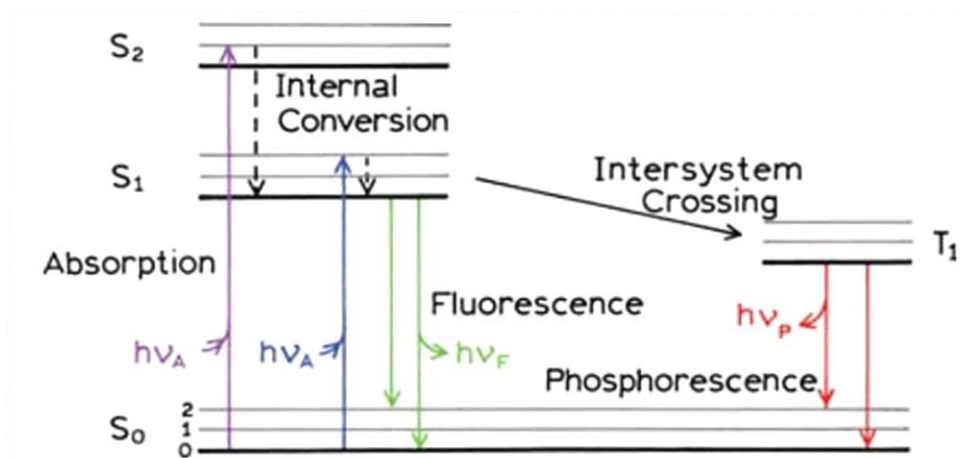


FIGURA 8 – Una forma del diagrama de Jablonski.

Se describen el estado basal, primer y segundo estado electrónico como S_0 , S_1 , S_2 respectivamente, en cada nivel el fluoróforo puede existir en diferentes niveles de energía vibracional descritas como 0,1,2, etc. Tanto la absorción como la emisión ocurre mayormente de los menores niveles de energía vibracional.

Lakowicz, J.R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2008.

PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE

La proteína fluorescente verde (GFP) proviene de la medusa bioluminiscente *Aequorea victoria*, su cromóforo este contenido al interior de su estructura tipo barril, la cual es producto de la disposición de once hebras hoja β rodeando una hélice central. Este cromóforo se origina espontáneamente al plegarse la forma polimérica, dado que se reordenan covalentemente tres aminoácidos (serina 65, tirosina 66 y glicina 67) que en presencia de oxígeno molecular se oxidan para formar el cromóforo. Dado que no necesita de síntesis enzimática para la composición del cromóforo y que su secuencia genética puede ser permutada circularmente, resultando en una nueva N- y C- terminal, sin que la proteína pierda su función, resulta una proteína de gran facilidad para su expresión genética dentro de las células, permitiendo su uso para diferentes tipos de análisis [13; 28].

El cromóforo formado dentro de esta proteína tiene la particularidad de existir tanto en su forma aniónica como también neutral, lo cual genera que la GFP posea dos bandas de absorbancia y excitación en observaciones espectroscópicas. En su forma neutral protonada, la absorción está en el espectro ultravioleta alrededor de los 395 nm, mientras que en su forma aniónica es alrededor de los 475 nm. Del mismo modo, las emisiones son observadas de forma diferente siendo asociados a los colores azul (460 nm) y verde (510 nm) respectivamente, sin embargo la emisión del color azul decae en unos 3 – 12 ps emparejándose con el aumento de la emisión del color verde^[28].

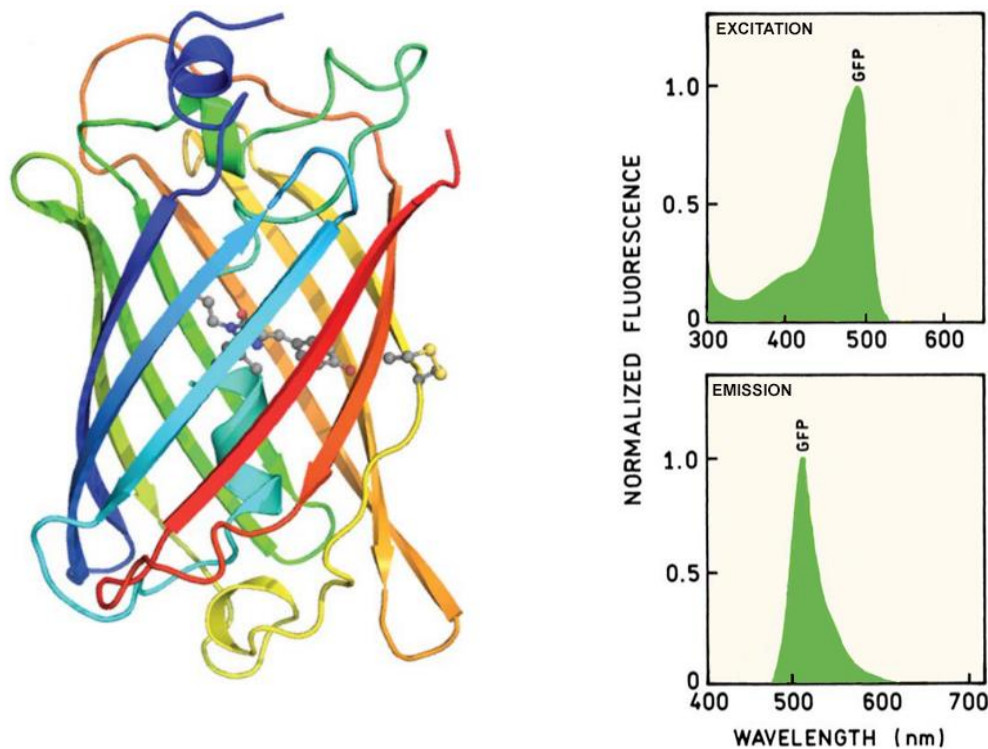


FIGURA 9 – Diagrama esquemático de la proteína fluorescente verde (GFP).

En la izquierda se encuentra la estructura de plegamineto que forma el barril β , en su interior el cromóforo unido covalentemente a la proteína. En azul se indica el inicio del N- terminal hacia el color rojo indicando el C- terminal de la cadena. El cromóforo es indicado en el formato de pelota y palos. A la derecha se muestra el espectro de excitación (arriba) y emisión (abajo) del GFP.

S. J. Remington, Green fluorescent protein: a perspective, 2011.

Modificado de Lakowicz, Joseph R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*,

3rd Edition, 2008.

DETERMINACIÓN DE DOPAMINA MEDIANTE BIOSENSORES DLIGHT1

Las nuevas tecnologías y avances en genética traen consigo a su vez nuevas técnicas para estudios científicos, este es el caso de biosensores como dLight1. Este biosensor se basa en la asociación entre el receptor de dopamina D1 con una proteína fluorescente verde permutada circularmente (cpGFP), la que es unida en el tercer loop intracelular del receptor de dopamina D1. Se destaca que esta unión no afectaría a la señalización realizada por la proteína G asociada al receptor, y además, este acoplamiento directo de ambos, permite asociar los cambios conformacionales del receptor de dopamina con intensidad de fluorescencia de la cpGFP, ya que esta proteína fluorescente verde emitirá fluorescencia solo cuando el receptor sea activado por su agonista (figura 10) [2; 24].

La introducción al organismo puede ser realizada mediante vectores adeno asociados (AAV) y puede acoplarse con optogenética para determinar la liberación de dopamina en el núcleo accumbens tanto en ex vivo como in vivo mediante una fibra insertada en el cerebro. Al asociarse los resultados mediante análisis computacionales se puede generar un mapa de calor que indique la expresión de dLight1, de esta forma permite indicar los niveles de liberación de dopamina^[24].

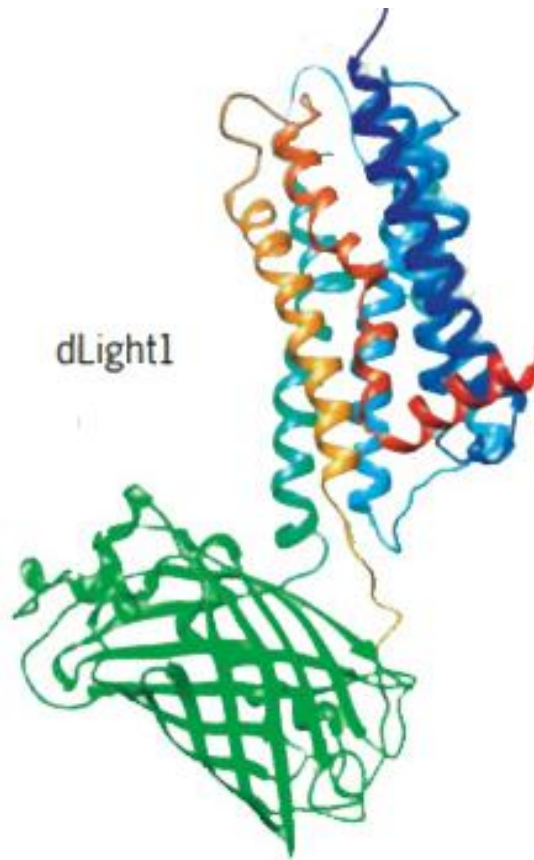


FIGURA 10 – Estructura del biosensor dLight 1.

Esquema que muestra la composición de este biosensor, el cual está constituido del receptor de dopamina D1 y una proteína fluorescente verde integrada en el tercer loop intracelular del receptor.

Patriarchi T. et al. Science. 2018.

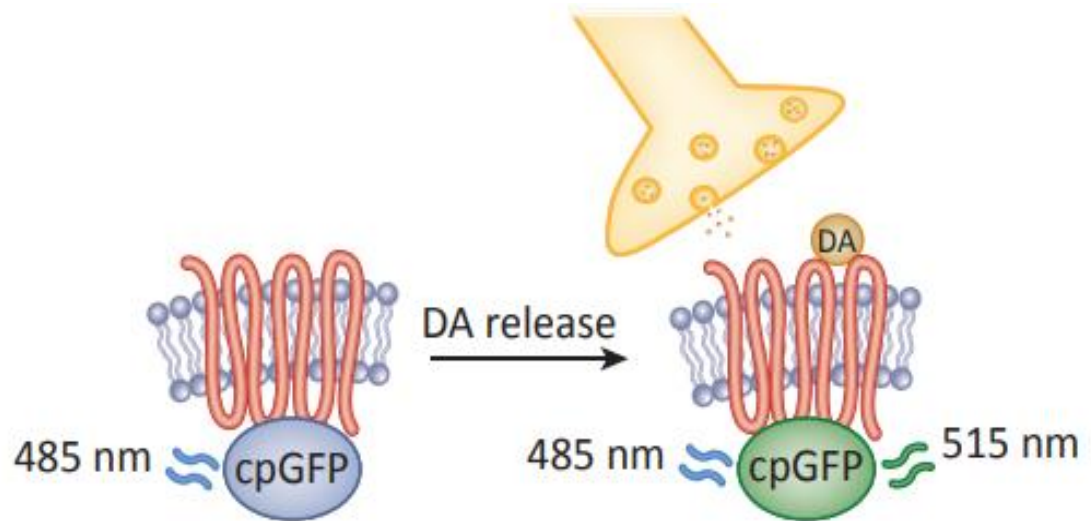


FIGURA 11 - Modelo esquemático del funcionamiento de dLight1.

Cuando una terminal presináptica cercana libera dopamina (DA), este agonista se une a dLight1, generando el cambio conformacional del receptor y permitiendo la emisión de fluorescencia por parte de la cpGFP.

Cosme et al. *Trends in Neurosciences*. 2018.

MONITOREO DE ACTIVIDAD NEURONAL CON OPTOGENÉTICA.

La optogenética permite controlar la actividad neuronal mediante la luz, y esta técnica se basa en la introducción de un vector que codifica Opsinas, unas proteínas sensibles a la luz, las cuales al ser iluminadas activan canales de cationes no selectivos, permitiendo una rápida despolarización celular y generando el impulso sináptico^[5]. Una de estas opsinas corresponde a la proteína canal Rodopsina-2 (ChR2), la cual es activada por luz azul y se registra su función óptima alrededor de los 470 nm^[5]. La ventaja que presenta esta técnica en comparación a la estimulación eléctrica es la posibilidad de modular células seleccionadas dentro de una variedad de tejidos complejos, permitiendo de esta forma activar regiones de interés y el estudio de su relación con otros sectores como lo es la interacción entre el VTA y el nAc ^[5].

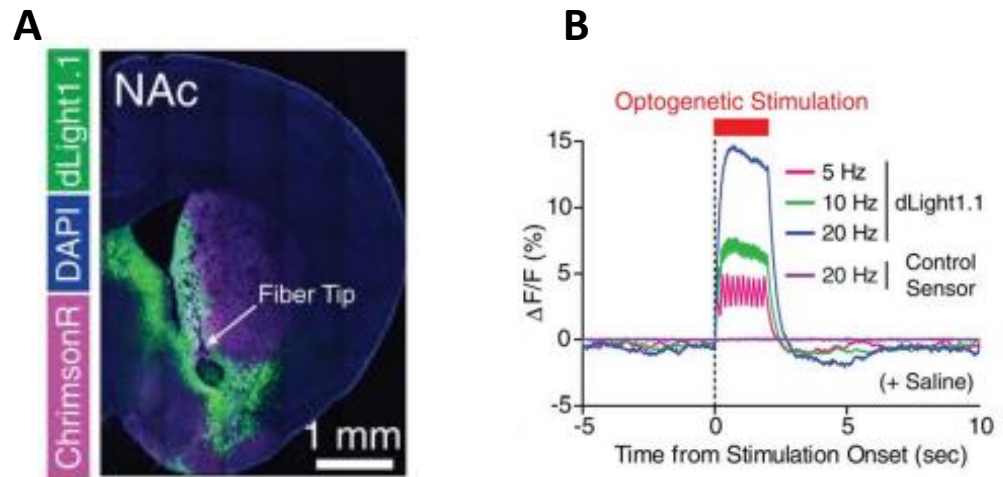


FIGURA 12 - Optogenética y dLight.

A) Emisión de fluorescencia por dLight en el núcleo accumbens mediante estimulación optogenética. **B)** Aumento de la fluorescencia promedio en respuesta a estímulos optogenéticos.

Patriarchi T. et al. Science. 2018

CONSIDERACIONES E HIPÓTESIS

Estas nuevas tecnologías en conjunto de los datos anteriormente aportados representan un atractivo blanco para nuevos estudios que permitan asociar la triada conducta, alcohol y receptores de glicina con la finalidad de entender los mecanismos involucrados en los inicios del consumo, y que posteriormente pueden derivar en procesos adictivos. Del mismo modo, estos antecedentes generan una serie de preguntas asociadas al proceso y efectos orquestados dentro del sistema para generar los cambios conductuales, dentro de las cuales se encuentra la pregunta: ¿Cuál es el rol que presenta la sensibilidad de los receptores de glicina $\alpha 1$ al etanol en la liberación de dopamina dentro del núcleo accumbens?. **En base a esta pregunta, se ha llegado a proponer la hipótesis: los receptores de glicina conteniendo la subunidad $\alpha 1$ participan en el aumento de dopamina del nAc, lo que sería incrementado en presencia de etanol.** De este modo y con la finalidad de que eventualmente pueda ser respondida esta incógnita, se presentarán a continuación unas metodologías sugeridas que abarca los elementos anteriormente mencionados, recalcando, que de ser posible estos estudios, tienen la finalidad de aportar nuevos datos para posteriores estudios farmacológicos, que permitan nuevas formas de enfrentar el problema de salud mundial que es el alcoholismo.

PROPUESTA METODOLÓGICA 1

ROL DEL RECEPTOR DE GLICINA EN LA LIBERACIÓN DE DOPAMINA EN EL NÚCLEO ACCUMBENS FRENTE A ETANOL

MODELO ANIMAL

El modelo animal a utilizar en este estudio corresponde a ratones adultos jóvenes (2-3 meses), los cuales deberán ser manejados y cuidados siguiendo los protocolos establecidos por el Instituto Nacional de Salud (NIH), estos protocolos deberán ser aprobados por los comités institucionales de uso y cuidado animal de la Universidad de Concepción, para su uso al interior de esta institución, las cuales están en línea con las recomendaciones del Comité de Uso y Cuidado Animal (ACUC) del NIH (National Institutes of Health, Maryland, USA).

1) Se utilizarán ratones C57BL/6J, en estos experimentos los ratones a utilizar se denominarán como WT (Wild type: sin mutación) y alfa 1 KI (Knock in: con alelo 1KK385-386AA) los cuales pueden ser dispuestos por los laboratorios

Jackson (Stock number 023516; Bar Harbor, ME, USA), estos deben ser genotipificados mediante extracción de ADN genómico desde la cola, usando un kit de extracción de ADN genómico en conjunto con reacción en cadena polimerasa (PCR) convencional con partidores KI sense 5'-TTG TAG CAT GGG AAA GCC AGA- 3' y Anti Sense 5'- ATG CTG AAA CAG ATG CAA GCC AGG- 3, cuyos productos pueden observarse por medio de gel electroforético de agarosa, los ratones KI presentarán una banda a los 400bp mientras que los ratones WT tendrán una banda a los 300bp, los animales heterocigotos presentarán 2 bandas^[21].

Ratones C57BL/6J

Electroforesis en Gel de agarosa

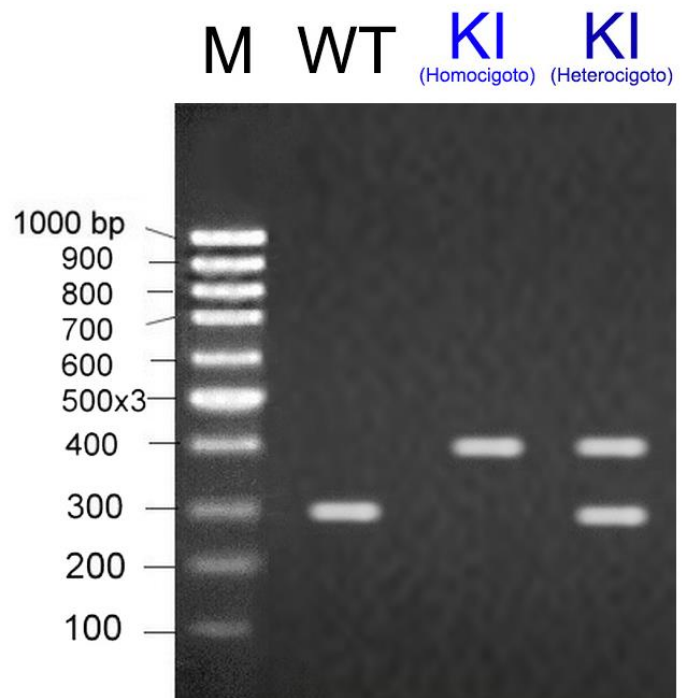
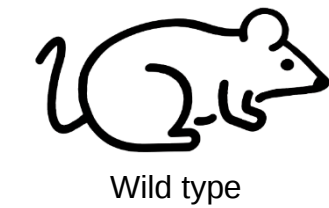


Figura 13 – Experimento 1: Modelo animal y genotipificación.

Esquema identificador de los modelos animales a utilizar, en conjunto del resultado esperado en su genotipificación mediante electroforesis en gel de agarosa. Para este ejemplo se utilizó de referencia el marcador de peso molecular de ADN BioBasic.

INYECCIÓN DE VECTOR VIRAL ADENO ASOCIADO CON DLIGHT1

2) Se inyectará un vector adeno asociado (AAV) en el NAc. El AAV recomendado corresponde a pAAV-hSyn-dLight1.2, que puede ser obtenido desde Addgene (Watertown, MA, USA). Este vector presenta un casete de expresión de una secuencia anti sentido para los receptores de dopamina DRD1 unida a la secuencia de la proteína fluorescente verde permutada circularmente (cpGFP) ^[24], estos ratones podrán ser utilizados para estudios 2 semanas después de la inyección, la cual se realizará tanto para los estudios mediados por estimulación eléctrica como también para los estudios asociados con optogenética.

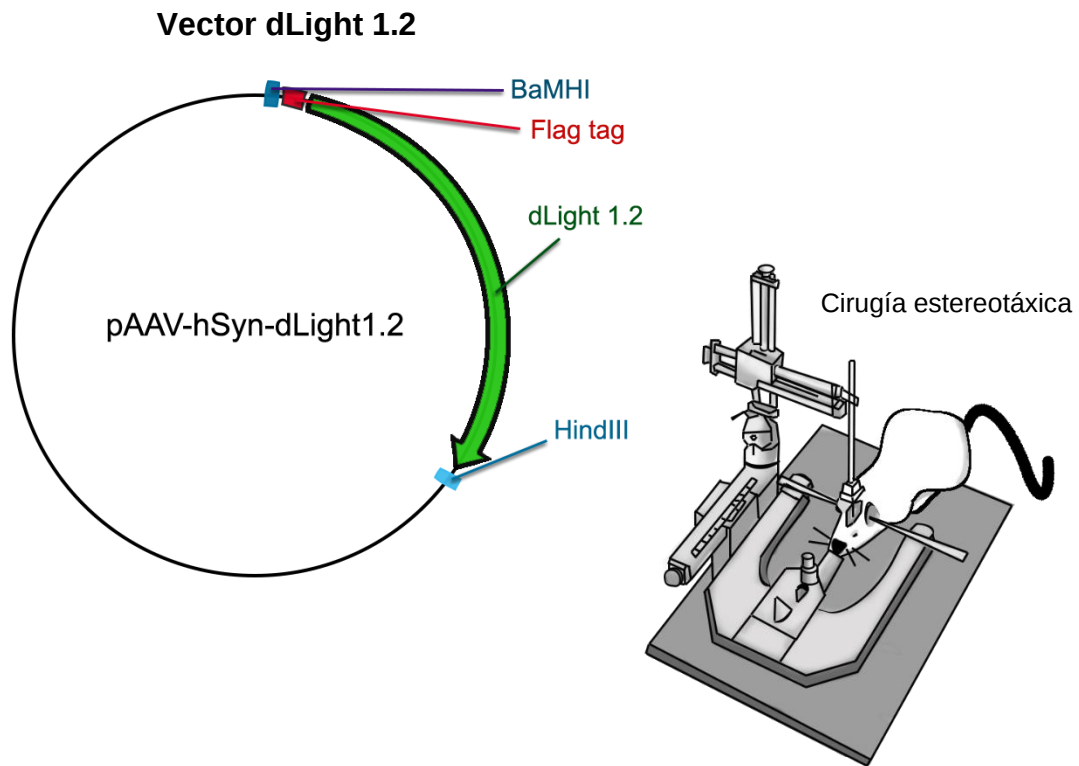


Figura 14 – Experimento 2: Vector asociado a dLight1.

El Vector adenoviral asociado comercializado por Addgene consta de 6622 pares de bases, incluyendo las enzimas de restricción BaMHI, HindIII y el octapeptido Flag como etiqueta. Este vector es administrado en el cerebro utilizando una inyección estereotáxica tanto en los ratones WT como en los KI.

PREPARACIÓN DE CORTES DE CEREBRO

Los ratones WT y KI serán anestesiados con halotano, posteriormente decapitados, y se extirpará el cerebro el que se colocará rápidamente en una solución helada de corte (en mM: sacarosa 194, NaCl 30, KCl 4.5, MgCl₂ 1, NaHCO₃ 26, NaH₂PO₄ 1.2, Glucosa 10, saturado con 95% O₂ y 5% CO₂ y con PH ajustado a 7.4). El cerebro es bloqueado en orientación coronal y colocado en una plataforma de un vibratomo VT1200S (Leica, Germany), y cortados con un espesor de 300 µm. Los cortes que contienen nAc son transferidos con una solución aCSF (solución artificial de fluido cerebroespinal que contiene en mM: NaCl 124, KCl 4.5, NaH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 26, D-Glucosa 10, burbujeando la solución con 95% O₂ y 5% CO₂ por 15 min y luego se le agrega 2 mM CaCl₂ y 1 mM MgCl₂ a 32°C con PH ajustado a 7.4 y 310-320 mOsm). A los cortes de cerebro se les permitirá reposar en aCSF a 32°C por al menos 1h antes de los ensayos^[11].

INDUCCIÓN DE CORRIENTE SINÁPTICA ELÉCTRICAMENTE ACTIVADA Y REGISTRO DE FLUORESCENCIA EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE ETANOL

3) Se posicionará un microelectrodo estimulante bipolar concéntrico (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) en el núcleo accumbens adyacente del sitio de registro. La fluorescencia producida será obtenida en un fotomultiplicador conectado a un sistema de adquisición de señales en las instalaciones del laboratorio. Las mediciones se realizarán en ausencia y presencia de alcohol en el medio, con concentraciones crecientes de etanol (5, 10 y 50 mM).

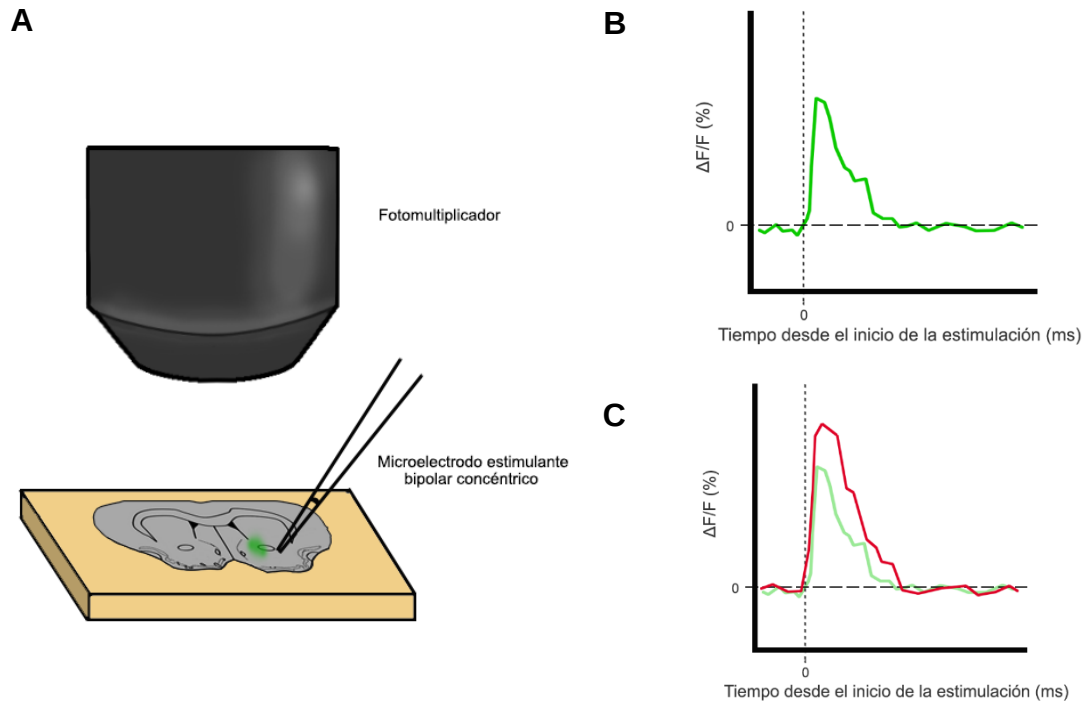


Figura 16 - Experimento 3: Registro de fluorescencia mediada por estimulación eléctrica.

A) Esquema de la configuración experimental. **B)** Resultado esperado: variación de fluorescencia ($\Delta F/F$) generados después de una única estimulación eléctrica sin presencia de alcohol (color verde). **C)** Resultado esperado: En este experimento se espera una variación de fluorescencia $\Delta F/F$ generados después de una única estimulación eléctrica en presencia de alcohol (rojo), que sea mayor que la obtenida en su ausencia (verde).

PROPUESTA METODOLÓGICA 2

COMUNICACIÓN ENTRE EL ÁREA VENTRAL TEGMENTAL Y EL NÚCLEO ACCUMBENS FRENTE A LA REGULACIÓN DE LOS RECEPTORES DE GLICINA POR ETANOL

VECTOR VIRAL ADENO ASOCIADO CON CHR2

4) Se utilizará el vector viral AAV5-hSyn-hChR2(H134R)-EYFP que contiene genes para channelrhodopsin-2^[4], que será introducido en los modelos animales previamente indicados (página 43) mediante un aparato estereotáxico en el VTA siguiendo las coordenadas descritas en bibliografías (The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates ; Franklin and Paxinos, 2007). La administración será realizada en ambos tipos de ratones (wild type y Knock in), los cuales serán anestesiados usando pentobarbital sódico (50mg/Kg, intraperitoneal), los ratones podrán ser sometidos a estudios 3 semanas después^[18].

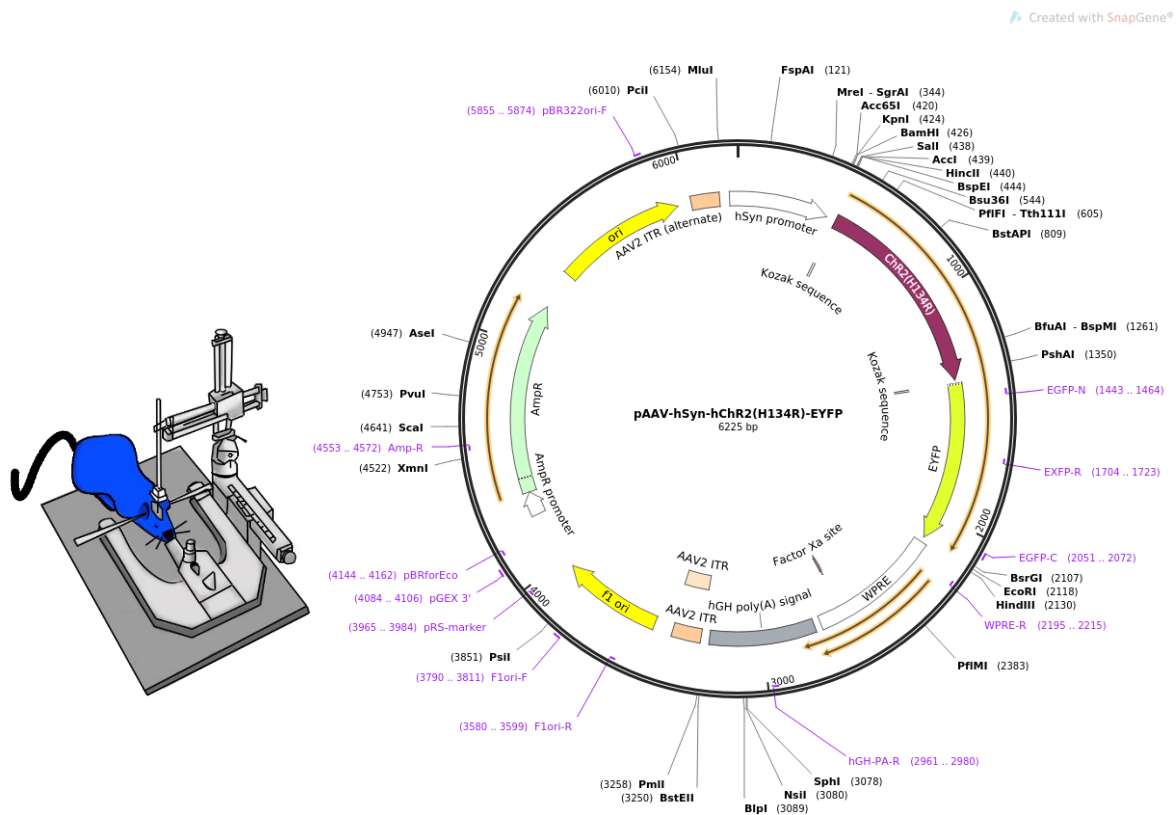


Figura 15 – Experimento 4: Vector asociado a Chr2.

El vector asociado a la opsina es ingresado al modelo animal mediante una cirugía estereotóxica, tanto en el WT como en el KI. El presente vector fue obtenido desde addgene, consta de 6225bp y contiene una proteína de fusión correspondiente a la proteína amarilla fluorescente.

Karl Deisseroth. Addgene viral prep # 26973-AAV5; RRID:Addgene_26973.

<http://n2t.net/addgene:26973>.

ESTIMULACIÓN OPTOGENÉTICA

5) Después de obtener las rebanadas (siguiendo los protocolos de la página 48), se aplicará una luz azul de fibra óptica a 470 nm por 1 ms de duración cada 30s y las imágenes serán obtenidas mediante un lente objetivo de 40x en un microscopio conectado a sistema de conversión análogo digital para análisis off-line de la señal y los estudios se realizarán en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de etanol (5, 10 y 50 mM).

6) Posteriormente se utilizará un antagonista competitivo para el receptor de dopamina D1 correspondiente al SKF83566 el cual será obtenido desde Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA) preparando una solución 5 μ M que será disuelta en aCSF antes de su uso^[32]. El uso de este antagonista tiene como finalidad confirmar que la fluorescencia obtenida es atribuible a la unión de DA con su receptor y no ocasionada por alguna otra fuente ^[24].

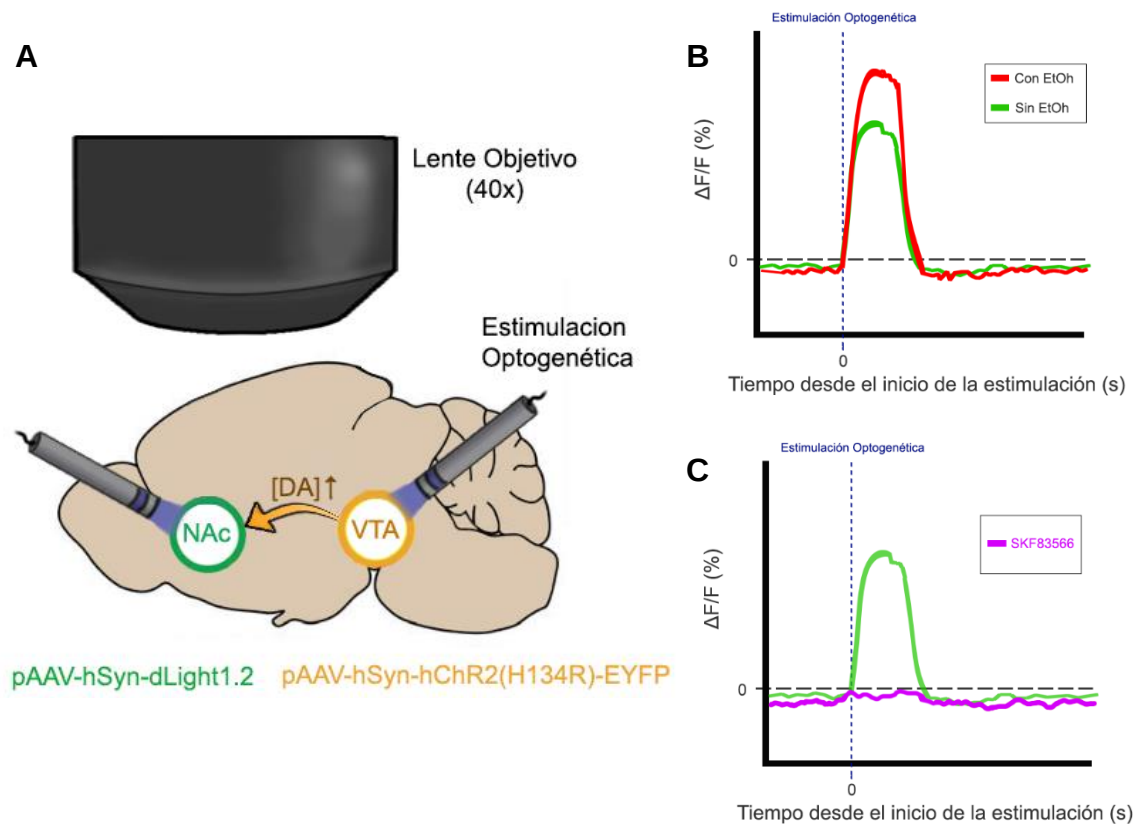


Figura 17 – Experimento 5 y 6: Estimulación optogenética.

A) Esquema de la configuración experimental. **B)** Resultado esperado del experimento, en donde se muestra el cambio de fluorescencia provocado tras la estimulación optogenética (verde), además, se muestra lo esperado en la respuesta $\Delta F/F$ frente a la presencia de alcohol (rojo). **C)** Resultado esperado de $\Delta F/F$ al utilizar el antagonista del receptor D1 (violeta) en comparación al $\Delta F/F$ obtenido tras el estímulo.

ANÁLISIS DE DATOS

Los datos corresponderán al aumento de fluorescencia verde con la liberación de DA en el nAc después de la estimulación eléctrica, se expresarán como $X \pm \text{SEM}$ y se compararán los datos obtenidos entre ratones WT y KI, tanto en presencia y ausencia de etanol. Los análisis se realizarán utilizando Student t-test de dos muestras no pareadas y posteriormente se usará F-test para confirmar variaciones similares para todos los datos. Los datos que no se distribuyan normalmente se analizarán mediante pruebas de rango con signo de Mann-Whitney de dos muestras. Finalmente, mediante los datos recopilados se espera observar un mayor aumento en fluorescencia en los ratones KI $\alpha 1$ en comparación a los ratones WT.

Del mismo modo deberán ser obtenidos los datos derivados de los estímulos optogenéticos del VTA, asociándose la relación entre el aumento de fluorescencia verde con la liberación de DA en el nAc después de la excitación a 470nm siguiendo el mismo protocolo anteriormente mencionados. También se tomarán en cuenta los datos recopilados frente al agonista del receptor de dopamina D1 como control de este método.

RESULTADOS ESPERADOS

Propuesta metodológica 1: En primer lugar, se espera lograr una correcta genotipificación de cada animal de estudio mediante electroforesis en gel de agarosa. Tras esto, y siguiendo la propuesta indicada, se espera que con una única estimulación eléctrica el modelo alfa 1 KI libere mas dopamina que el modelo WT. Esto estaría asociado a su insensibilidad al etanol, dado que en el modelo KI, el RGly no estaría siendo potenciado en la vía intracelular por este PAM, disminuyendo de esta forma el efecto inhibitorio que debería ejercer este receptor dentro de las MSNs en su propia vía inhibitoria, causando una alta recompensa.

Propuesta metodológica 2: En este experimento se espera evidenciar que el modelo alfa 1 KI libera más DA que el modelo WT siguiendo la estimulación optogenética, evidenciando la inervación existente entre el VTA y el nAc. En este caso se manifestará que la despolarización de terminales nerviosos provenientes del VTA liberan más neurotransmisores en la presencia de etanol. El etanol estaría desinhibiendo el circuito al potenciar el GlyR en neuronas GABAergicas que se encuentran en el VTA como en el nAc.

CARTA GANTT

Objetivo		Tarea	Meses									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Determinar la liberación de dopamina en rebanadas del núcleo accumbens mediante estimulación eléctrica en ratones Knock-in $\alpha 1$ y wild type en ausencia y presencia de etanol.	1.1	Obtención de animales									
		1.2	Inyección de vector viral adeno asociado con dLight1. (estandarizacion tecnica)									
		1.3	Preparación de cortes de cerebro									
		1.4	Inducción de corriente sináptica eléctricamente activada y registro de fluorescencia en ausencia y presencia de etanol.									
		1.5	Análisis de datos									
2	Determinar la liberación de dopamina en rebanadas del núcleo accumbens mediante estimulación optogenética en ratones Knock-in $\alpha 1$ y wild type en ausencia y presencia de etanol.	2.1	Obtención de animales									
		2.2	Inyección de vector viral adeno asociado con dLight1. (estandarizacion tecnica)									
		2.2.1	Vector viral adeno asociado con ChR2 (estandarizacion tecnica)									
		2.3	Preparación de cortes de cerebro									
		2.4	Observación mediante Optogenética									
		2.5	Análisis de datos									
		2.6	Elaboración de escrito.									

DISCUSIÓN

Si bien en el presente texto no se cuentan con resultados empíricos propiamente tal, se discutirán los diferentes puntos que pueden afectar los posibles datos se podrían recopilar y las diferentes modificaciones que pueden permitir mejoras y/o futuros experimentos basados en la metodología anteriormente mencionada.

Dentro de los primeros problemas que nos encontramos al estudiar el sistema de recompensa y en general al hablar del sistema nervioso, es el hecho de que no debemos omitir que es una extensa red intercomunicada entre las diferentes regiones que lo componen, y su complejidad aún no ha sido totalmente descrita como lo indica Hu H. en su review (2016) del sistema de recompensa y aversión^[9]. Es por ello que desde el inicio debemos tomar en cuenta que, si bien las mediciones son realizadas basándonos exclusivamente en el efecto del alcohol en el receptor de glicina dentro del VTA y el nAc y pueden aportar datos iniciales asociados a este proceso, desconocemos toda la red y mecanismos de compensación que pueden estar involucrados, ya sean debido a la presencia de alcohol u otras vías involucradas que indirectamente puedan afectar la liberación de dopamina.

Respecto al receptor de glicina utilizado, este experimento está asociado exclusivamente a la interacción del alcohol con el receptor de glicina $\alpha 1$ mediado vía proteína G asociada a los aminoácidos K385 y K386, sin embargo, es necesario tomar en cuenta que no es la única vía de interacción con el etanol que posee este receptor^[35; 36]. Si bien, este modelo Knock-in aporta abundantes datos del mecanismo involucrado, es importante plantear la importancia de los otros sitios de interacción en los mecanismos de acción, como también lo es la respuesta que pueden presentar los diferentes tipos de receptores de glicina frente al etanol, teniendo en consideración que existen tanto receptores homopentaméricos como también heteropentaméricos entre subunidades funciones y estructurales los cuales deberían ser estudiados en futuros experimentos.

La metodología anteriormente planteada ya ha sido utilizada por Patriarchi et al. en el año 2018^[24] evidenciando la liberación de dopamina por medio de dLight dentro del nAc utilizando estimulaciones optogenética en el VTA en su investigación asociada a estos biosensores. Así se ha modificado este experimento para comprobar los mecanismos asociados al etanol mediante el uso de los modelos animales ya propuestos y utilizados por Gallegos S. et al en sus múltiples investigaciones^[7; 21]. Con esto planteado y viendo los resultados obtenidos en ambas investigaciones se consolida esta metodología propuesta, pero, además, es posible que puedan existir modificaciones que aporten a esta

o futuras investigaciones basados en las diferentes herramientas e investigaciones disponibles.

En este ámbito cabe destacar que existen diferentes tipos de opsinas, esto se plantea por el hecho de que las longitudes de ondas utilizadas por dLight1 para la fluorescencia y por la opsina ChR2 para la estimulación, se encuentran ambas alrededor de los 480 nm, lo cual podría conllevar a la idea de la existencia de un acoplamiento tanto entre estimulación y emisión, sin embargo, dLight1 solo emite fluorescencia al encontrarse el receptor unido a su ligando y las opsinas serían integradas en neuronas del VTA, por lo que esta distancia, sería lo suficiente para no producirse una mayor estimulación al aplicarse luz en el nAc durante el registro del biosensor. Por otro lado, se podría optar por utilizar opsinas cuya función sea optima en una longitud de onda diferente, como lo es el caso de VChR1, C1V1, Chrimson, entre otras, que están asociados a la estimulación mediada por luz roja^[3; 12].

CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES

Dado a la situación mundial de pandemia, este texto ha sido realizado sin la intención de recopilar resultados de investigación, sino más bien, con la finalidad de realizar una recopilación bibliográfica del tema en cuestión. De esta forma y dejando las bases planteadas para la realización de este estudio se espera que en un futuro se pueda confirmar o refutar la hipótesis planteada en este manuscrito. De este modo será importante involucrarse más profundamente en la búsqueda de información asociada a este tema, ya que cada año se aportan nuevos datos desde diferentes partes e investigadores del mundo, que están comprometidos con generar un mayor entendimiento neurobiológico de los mecanismos involucrados en los diferentes procesos que llevan a la generación de una adicción.

En cuanto a las proyecciones que representa la realización de la metodología propuesta, se debe considerar que plantearía bases para posteriores investigaciones asociadas al comportamiento, y dado que la optogenética puede ser aplicada tanto en modelos *ex vivo* como *in vivo*, nos abriría paso a especular metodologías asociadas al estímulo *in vivo* del VTA y los comportamientos de ratones en presencia y ausencia de etanol, como también, y más a largo plazo, las modificaciones frente a este estímulo cuando se utilizan modelos con adicciones alcohólicas, y como este mecanismo asociado a los receptores de glicina puede verse afectado producto de esta adicción. Destacando finalmente que el objetivo de todas estas investigaciones es entender los mecanismos, desde sus inicios, que desembocan en la formación de la adicción al alcohol en pos de dilucidar tratamientos para esta enfermedad.

GLOSARIO

Adicción: Enfermedad física o psicoemocional que crea una dependencia o necesidad hacia una sustancia, actividad o relación. Caracterizado por un conjunto de signos y síntomas, en los que se involucran factores biológicos, genéticos y sociales.

Alcoholismo: Enfermedad crónica con factores genéticos, psicológicos y ambientales. Es una enfermedad que suele ser progresiva y fatal, siendo caracterizada por el control deficiente del consumo excesivo de alcohol y su uso a pesar de las consecuencias adversas, distorsión en el pensamiento, generalmente asociadas a negación. Cada síntoma puede ser continuo o periódico.

Área Ventral Tegmental (VTA): Una región en el mesencéfalo que esta dorsomedial a la sustancia negra y ventral al núcleo rojo. Desde aquí se originan los sistemas dopaminérgicos mesocortical y mesolímbico, incluyendo una importante proyección al Núcleo accumbens.

Aversión: Rechazo o repugnancia frente a alguien o algo. En terapia constituye un tratamiento para suprimir comportamientos mediante la simultanea exposición del sujeto a consecuencias no placenteras.

Biosensores: sondas biomoleculares usadas para medir la presencia o concentración de moléculas biológicas, estructuras biológicas, microorganismos. Traduciendo una interacción bioquímica de la sonda en una señal física cuantificable.

DLight 1: Biosensor compuesto de la unión entre el receptor de dopamina D1 y una proteína fluorescente verde. Es capaz de emitir fluorescencia en el espectro del color verde (515nm) cuando el biosensor se encuentra unido a glicina y es estimulada por luz a una longitud de onda alrededor de los 485nm (color azul).

Dopamina (DA): Un neurotransmisor de la familia de las catecolaminas. Deriva de la tirosina y es el precursor de la norepinefrina y la epinefrina. La dopamina es un transmisor importante en el sistema extrapiramidal del cerebro, y es importante en la regulación del movimiento. Una familia de receptores es el que media su acción.

Fluorescencia: la propiedad de emitir radiación mientras se es irradiado. La radiación emitida es usualmente de menor longitud de onda respecto al incidente o absorbida.

Knock-in: Técnicas genéticas utilizadas para añadir un gen exógeno para estudiar mecanismos asociados a la expresión de genes; o secuencias de control reguladoras para estudiar efectos asociados a cambios temporales de expresión genética.

Knock-out: Técnicas genéticas utilizadas para alterar la secuencia de un gen que da como resultado un gen inactivo, o uno cuya expresión puede inactivarse en un momento elegido durante el desarrollo para estudiar la pérdida de la función de un gen.

Ligando: Una molécula que se une a otra molécula, usado especialmente para referirse a pequeñas moléculas que se unen específicamente a una molécula más larga. También son moléculas que donan o aceptan un par de electrones para formar uniones covalentes con el átomo de metal central de un complejo coordinado.

Modulación/regulación alostérica: Corresponde a la modificación de la reactividad de una enzima por medio de la unión de efectores a sitios en la enzima diferentes al sitio de unión del sustrato.

Neurotransmisor: Sustancias usadas por sus acciones farmacológicas sobre cualquier aspecto de los sistemas de neurotransmisores. En estos se incluyen agonistas, antagonistas, degradación, inhibidores, inhibidores de la captación, reductores, precursores y moduladores de la función de receptores.

Núcleo Accumbens (nAc): Conjunto de células pleomórficas en la parte caudal de la asta anterior del ventrículo lateral, en la región tubérculo olfatorio, que se encuentra entre la cabeza del núcleo caudado y la sustancia prefrontal anterior. Es parte del llamado cuerpo estriado, una estructura compuesta que es considerada parte de los ganglios basales.

Opsinas: Proteínas fotosensibles en las membranas de células fotorreceptoras como los bastones y los conos. Las opsinas tienen propiedades de absorción de luz variada y son miembros de la familia de receptores acoplados a proteína G. Sus ligandos son cromóforos basados en vitamina A.

Pseudogen: Genes que se parecen mucho a genes conocidos en diferentes loci, pero que se vuelven no funcionales por adicciones o deleciones en la estructura que impiden la transcripción o traducción normal.

Receptor dopamina D1: Una subfamilia de receptores acoplados a proteína G que se unen al neurotransmisor dopamina y modulan sus efectos. Los genes de los receptores de clase D1 carecen de intrones y los receptores estimulan ciclasa de adenililo.

Receptor de glicina: Receptores de superficie celular que se unen a glicina con alta afinidad y desencadenan cambios intracelulares que influyen en el comportamiento de las células. En el sistema nervioso central tienen un canal de cloruro intrínseco. El receptor GlyA es sensible a la estricnina y se localiza en la membrana postsináptica de las neuronas glicinérgicas inhibitorias. El GlyB es insensible a estricnina y se asocia con el receptor NMDA excitador.

Recompensa: un objeto o una situación que puede servir para reforzar una respuesta, para satisfacer un motivo, o para proporcionar placer.

BIBLIOGRAFÍA

1. Breiteringer, U., and H. G. Breiteringer. (2020). 'Modulators of the Inhibitory Glycine Receptor', *ACS Chem Neurosci*, 11: 1706-25.
2. Cosme, C. V., G. K. Palissery, and T. N. Lerner. (2018). 'A dLight-ful New View of Neuromodulation', *Trends Neurosci*, 41: 566-68.
3. Deisseroth, K., and P. Hegemann. (2017). 'The form and function of channelrhodopsin', *Science*, 357.
4. Deisseroth, Karl. "pAAV-hSyn-hChR2(H134R)-EYFP " In. Addgene Recuperado en <https://www.addgene.org/26973/> [2021, 27 de diciembre].
5. Duebel, J., K. Marazova, and J. A. Sahel. (2015). 'Optogenetics', *Curr Opin Ophthalmol*, 26: 226-32.
6. El-Sherbeni, A. A., M. R. Stocco, F. B. Wadji, and R. F. Tyndale. (2020). 'Addressing the instability issue of dopamine during microdialysis: the determination of dopamine, serotonin, methamphetamine and its metabolites in rat brain', *J Chromatogr A*, 1627: 461403.
7. Gallegos, S., B. Munoz, A. Araya, and L. G. Aguayo. (2019). 'High ethanol sensitive glycine receptors regulate firing in D1 medium spiny neurons in the nucleus accumbens', *Neuropharmacology*, 160: 107773.

8. Gallegos, S., L. San Martin, A. Araya, D. M. Lovinger, G. E. Homanics, and L. G. Aguayo. (2020). 'Reduced sedation and increased ethanol consumption in knock-in mice expressing an ethanol insensitive alpha 2 subunit of the glycine receptor', *Neuropsychopharmacology*, 46: 528-36.
9. Hu, H. (2016). 'Reward and Aversion', *Annu Rev Neurosci*, 39: 297-324.
10. Hussein, R. A., M. Ahmed, H. G. Breiting, and U. Breiting. (2019). 'Modulation of Glycine Receptor-Mediated Pain Signaling in vitro and in vivo by Glucose', *Front Mol Neurosci*, 12: 280.
11. Jun, S. B., V. Cuzon Carlson, S. Ikeda, and D. Lovinger. (2011). 'Vibrodissociation of neurons from rodent brain slices to study synaptic transmission and image presynaptic terminals', *J Vis Exp*.
12. Klapoetke, N. C., Y. Murata, S. S. Kim, S. R. Pulver, A. Birdsey-Benson, Y. K. Cho, T. K. Morimoto, A. S. Chuong, E. J. Carpenter, Z. Tian, J. Wang, Y. Xie, Z. Yan, Y. Zhang, B. Y. Chow, B. Surek, M. Melkonian, V. Jayaraman, M. Constantine-Paton, G. K. Wong, and E. S. Boyden. (2014). 'Independent optical excitation of distinct neural populations', *Nat Methods*, 11: 338-46.
13. Lakowicz, Joseph R. (2008). *Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd Edition* (Springer).
14. Le Dare, B., V. Lagente, and T. Gicquel. (2019). 'Ethanol and its metabolites: update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects', *Drug Metab Rev*, 51: 545-61.
15. Liu, C., and P. S. Kaeser. (2019). 'Mechanisms and regulation of dopamine release', *Curr Opin Neurobiol*, 57: 46-53.

16. McCracken, L. M., D. C. Lowes, M. C. Salling, C. Carreau-Vollmer, N. N. Odean, Y. A. Blednov, H. Betz, R. A. Harris, and N. L. Harrison. (2017). 'Glycine receptor alpha3 and alpha2 subunits mediate tonic and exogenous agonist-induced currents in forebrain', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: E7179-E86.

17. Minsal. (2019). "Prevalencia de trastornos por consumo de alcohol." In.

18. Miyamoto, Y., A. Iida, K. Sato, S. Muramatsu, and A. Nitta. (2014). 'Knockdown of dopamine D₂ receptors in the nucleus accumbens core suppresses methamphetamine-induced behaviors and signal transduction in mice', *Int J Neuropsychopharmacol*, 18.

19. Molander, A., E. Lof, R. Stomberg, M. Ericson, and B. Soderpalm. (2005). 'Involvement of accumbal glycine receptors in the regulation of voluntary ethanol intake in the rat', *Alcohol Clin Exp Res*, 29: 38-45.

20. Molander, A., and B. Soderpalm. (2005). 'Glycine receptors regulate dopamine release in the rat nucleus accumbens', *Alcohol Clin Exp Res*, 29: 17-26.

21. Muñoz, B., S. Gallegos, C. Peters, P. Murath, D. M. Lovinger, G. E. Homanics, and L. G. Aguayo. (2019). 'Influence of nonsynaptic alpha1 glycine receptors on ethanol consumption and place preference', *Addict Biol*, 25: e12726.

22. Nakanishi, S., T. Hikida, and S. Yawata. (2014). 'Distinct dopaminergic control of the direct and indirect pathways in reward-based and avoidance learning behaviors', *Neuroscience*, 282: 49-59.

23. Pastor, Francisco Pascual. (2007). 'Aspectos antropológicos del consumo de bebidas alcohólicas en las culturas mediterráneas', *Salud y drogas*, 7: 249-62.

24. Patriarchi, T., J. R. Cho, K. Merten, M. W. Howe, A. Marley, W. H. Xiong, R. W. Folk, G. J. Broussard, R. Liang, M. J. Jang, H. Zhong, D. Dombeck, M. von Zastrow, A. Nimmerjahn, V. Gradinaru, J. T. Williams, and L. Tian. (2018). 'Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors', *Science*, 360.
25. Pierce, R. C., and V. Kumaresan. (2006). 'The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse?', *Neurosci Biobehav Rev*, 30: 215-38.
26. Purves, Dale, George J. Augustine, David Fitzpatrick, and William C. Hall. (2004). *Neuroscience*.
27. Rajendra, S., J. W. Lynch, and P. R. Schofield. (1997). 'The glycine receptor', *Pharmacol Ther*, 73: 121-46.
28. Remington, S. J. (2011). 'Green fluorescent protein: a perspective', *Protein Sci*, 20: 1509-19.
29. Salud, Organizacion Mundial de la. (2010). 'Estrategia mundial para reducir el uso nocivo del alcohol'. https://www.who.int/substance_abuse/activities/msbabcstrategies.pdf.
30. Salud, Organización Panamericana de la. (2019). "Informe sobre la situación mundial del alcohol y la salud 2018 Resumen." In. Washington, D.C.
31. Spanagel, R. (2009). 'Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior', *Physiol Rev*, 89: 649-705.
32. Stouffer, M. A., S. Ali, M. E. Reith, J. C. Patel, F. Sarti, K. D. Carr, and M. E. Rice. (2011). 'SKF-83566, a D1-dopamine receptor antagonist, inhibits the dopamine transporter', *J Neurochem*, 118: 714-20.

33. Trujillo, Ricardo Bahena, Gonzalo Flores, and José A. AriasMontaño. (2000). 'Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central.', *Rev Biomed*, 11: 39-60.
34. Volkow, N. D., J. S. Fowler, G. J. Wang, R. Baler, and F. Telang. (2009). 'Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction', *Neuropharmacology*, 56 Suppl 1: 3-8.
35. Yevenes, G. E., and H. U. Zeilhofer. (2011). 'Allosteric modulation of glycine receptors', *Br J Pharmacol*, 164: 224-36.
36. Zhu, L., and J. H. Ye. (2005). 'The role of G proteins in the activity and ethanol modulation of glycine-induced currents in rat neurons freshly isolated from the ventral tegmental area', *Brain Res*, 1033: 102-8.